

妊娠期砷暴露对 F1 代成年雄性大鼠睾酮合成和精子质量的影响

徐倩, 陈益钦, 王琪, 姚镜, 王盼琳, 王文祥

福建医科大学公共卫生学院, 卫生检验与检疫学系/福建省环境与健康重点实验室, 福建 福州 350108

摘要:

[背景] 砷是一种发育毒物, 可通过胎盘屏障影响子代健康, 但妊娠期环境水平砷暴露对子代成年雄性生殖功能的影响有待探究。

[目的] 探讨妊娠期环境水平砷暴露对 F1 代成年雄鼠睾酮合成及精子质量的影响。

[方法] 40 只性成熟 Wistar 雌鼠按体重随机分为 4 组, 分别为对照组和低、中、高剂量亚砷酸钠(NaAsO_2)暴露组, 每组 10 只, 经适应性喂养后与性成熟 Wistar 雄鼠按 2:1 进行合笼, 以发现阴栓或阴道涂片观察到精子日确认为受孕日(GD0)。孕鼠从 GD0 起开始干预直至分娩出 F1 代, 低、中、高剂量组分别摄入含 1、5、25 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NaAsO_2 的饮用水, 对照组给予不含砷的双蒸水。F1 代雄鼠于 70 日龄处死, 测量肛殖距离, 取睾丸、附睾称重并计算脏器系数; 测定附睾精子质量; 观察睾丸组织学变化; 利用 ELISA 试剂盒测定血清睾酮及雌二醇水平; 采用实时荧光定量 PCR 技术测定睾丸类固醇激素关键酶的 mRNA 相对表达水平; 采用 Western blotting 测定睾丸类固醇激素合成关键酶的蛋白相对表达水平。

[结果] 与对照组相比, 低、中剂量组的睾丸及附睾脏器系数增大($P < 0.05$), 高剂量组的附睾脏器系数也增大($P < 0.05$)。在精子活动度构成比方面: 与对照组相比, 低剂量组中 I 级精子比例升高, 而在中、高剂量组下降; II、III 级精子比例在低、高剂量组均降低; IV 级精子比例在中、高剂量组上升; 以上差异均具有统计学意义($P < 0.05$)。与对照组相比, 各剂量组血清睾酮水平均升高($P < 0.05$), 高剂量组的雌二醇水平下降($P < 0.05$)。相对于对照组, 高剂量组的 *Hsd3 β 1* 和 *Cyp19a1* 的 mRNA 表达下调($P < 0.05$), 而 *StAR* 和 *Cyp11a1* 的 mRNA 表达上调($P < 0.05$)。低、中、高剂量组的 CYP11 A1 蛋白表达量均高于对照组($P < 0.05$)。

[结论] 妊娠期环境水平的砷暴露可诱导睾酮异常增高及降低子代雄鼠精子质量, 是影响雄性后代生殖健康的潜在危险因素。

关键词: 砷; 妊娠期暴露; 子代雄性; 睾酮合成; 发育毒性

Impact of arsenic exposure during gestation on testosterone synthesis and sperm quality in F1 adult male rats XU Qian, CHEN Yiqin, WANG Qi, YAO Jing, WANG Panlin, WANG Wenxiang (Department of Health Inspection and Quarantine/Key Laboratory of Environment and Health, School of Public Health, Fujian Medical University, Fuzhou, Fujian 350108, China)

Abstract:

[Background] Arsenic is recognized as a kind of developmental toxicant, which can pass through the placenta barrier and induce health defects in offspring. However, the effects of environmental levels of arsenic exposure during gestation on the reproductive system of adult male offspring remain unclear.

[Objective] To investigate the impact of environmental levels of arsenic exposure during gestation on testosterone synthesis and sperm quality in F1 adult male rats.

[Methods] Forty sexually mature Wistar female rats were randomly divided into four groups according to body weight, namely control group, low-dose sodium arsenite (NaAsO_2) group, middle-dose NaAsO_2 group, and high-dose NaAsO_2 group. They were mated with sexually mature Wistar male rats in a ratio of 2:1, and the day with presence of a vaginal plug or spermatozoa in the vaginal smear was designated as gestational day 0 (GD0). Pregnant rats were provided drinking water containing 0, 1, 5, or 25 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NaAsO_2 until delivery. At postnatal day 70, the F1 male rats were euthanized. Anogenital distance was measured, testis and epididymis were weighed, and



DOI 10.11836/JEOM21592

基金项目

福建省自然科学基金项目(2019J01312, 2022J01238)

作者简介

徐倩(1995—), 女, 硕士生;

E-mail: 935675194@qq.com

通信作者

王文祥, E-mail: wangwenxiang@fjmu.edu.cn

伦理审批 已获取

利益冲突 无申报

收稿日期 2021-12-13

录用日期 2022-07-20

文章编号 2095-9982(2022)09-1038-07

中图分类号 R114

文献标志码 A

引用

徐倩, 陈益钦, 王琪, 等. 妊娠期砷暴露对 F1 代成年雄性大鼠睾酮合成和精子质量的影响 [J]. 环境与职业医学, 2022, 39(9): 1038-1044.

本文链接

www.jeom.org/article/cn/10.11836/JEOM21592

Funding

This study was funded.

Correspondence to

WANG Wenxiang, E-mail: wangwenxiang@fjmu.edu.cn

Ethics approval Obtained

Competing interests None declared

Received 2021-12-13

Accepted 2022-07-20

To cite

XU Qian, CHEN Yiqin, WANG Qi, et al. Impact of arsenic exposure during gestation on testosterone synthesis and sperm quality in F1 adult male rats[J]. Journal of Environmental and Occupational Medicine, 2022, 39(9): 1038-1044.

Link to this article

www.jeom.org/article/en/10.11836/JEOM21592

associated organ coefficients were calculated. Epididymal sperm quality was evaluated. The histological changes of testis were observed. The levels of testosterone and estradiol in serum were determined with ELISA kit. The testicular mRNA relative expression levels of key steroidogenic enzymes were determined by quantitative real-time PCR. The protein relative expression levels of key steroidogenic enzymes were determined by Western blotting.

[Results] Compared with the control group, the testicular coefficients and epididymis coefficients were increased in the low- and middle-dose groups ($P < 0.05$), and the epididymis coefficient was also increased in the high-dose group ($P < 0.05$). As for the percentage of sperm motility, compared to the control group, grade I sperm cells were increased in the low-dose group, but significantly decreased in the middle- and high-dose groups; grade II and III sperm cells were decreased in the low- and high-dose groups; grade IV sperm cells were significantly increased in the middle- and high-dose groups; all the differences above were statistically significant ($P < 0.05$). Compared with the control group, there was a significant increase in serum testosterone levels in all treated groups ($P < 0.05$), and the serum estradiol levels were significantly decreased in the high-dose group ($P < 0.05$). Meanwhile, compared with the control group, the relative mRNA expression levels of *Hsd3 β 1* and *Cyp19a1* were decreased ($P < 0.05$), while those of *StAR* and *Cyp11a1* were increased in the high-dose group ($P < 0.05$). In addition, the relative protein expression levels of CYP11A1 were significantly increased in all treated groups compared with the control group ($P < 0.05$).

[Conclusion] Environmental levels of arsenic exposure during gestation can up-regulate testosterone level and reduce sperm quality, and is a potential risk for reproductive dysfunction in adult male offspring.

Keywords: arsenic; prenatal exposure; male offspring; testosterone synthesis; developmental toxicity

砷是自然界普遍存在的一种有毒类金属,据报道目前全球尚有数亿人长期接触含砷量超过国际限值的饮用水^[1]。近年来,越来越多证据表明生命早期砷暴露增加了新生儿及成年疾病发生的风险,包括不良妊娠结局、心血管疾病、呼吸系统疾病、免疫系统的改变及癌症^[2]。早期胚胎发育阶段是性腺发育的关键窗口期,此阶段母体的毒物暴露可能对子代生殖系统造成长期的毒效应^[3]。已有研究表明,砷可通过胎盘屏障进入子代体内,抑制雄性胎鼠的睾丸精原细胞发育^[4],降低青春期前的雄鼠睾丸生精小管直径和间质细胞核体积^[5]。有学者指出,生命早期环境毒物暴露引起的生殖系统异常,往往是在青春期之后变得更为明显^[6]。瑞士的一项人群研究指出,母亲孕期职业性接触重金属增加儿子低精子密度的风险^[7]。动物实验发现,孕鼠在妊娠第8天到第18天暴露于含85 mg·L⁻¹亚砷酸钠(NaAsO₂)的饮用水,可引起雄性子代睾丸形态破坏及精子质量下降^[8]。然而,目前鲜见环境水平砷暴露对雄性子代成年生殖系统影响的研究。基于以上研究现状,本研究拟通过模拟环境浓度砷暴露,建立妊娠期NaAsO₂暴露的动物模型,探讨妊娠期砷暴露对成年雄性大鼠睾酮合成及精子质量的影响,以期丰富生命早期砷暴露对子代成年雄性生殖系统影响的相关研究证据。

1 对象与方法

1.1 主要试剂与仪器

主要试剂: NaAsO₂(湖南艾科瑞生物工程有限公司,中国),苏木素—伊红染液、吉姆萨染液染色液(10×)、RIPA裂解液、BCA试剂盒(上海碧云天生物技术

有限公司,中国),目的基因引物(上海生工生物技术服务有限公司,中国),mRNA逆转录试剂、荧光定量PCR试剂(TaKaRa 宝生物工程大连有限公司,中国),ELISA试剂盒(武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司,中国),DMEM/F12培养基(Gibco,美国),PVDF膜、ECL化学发光液(Millipore,美国),兔抗StAR抗体(CST,美国),兔抗CYP11A1抗体、兔抗CYP19A1抗体、兔抗GAPDH抗体(Abcam,英国),HRP标记二抗(EarthOx,美国)。

主要仪器: MTP生物组织自动脱水机(SLEE,德国),EG1150生物组织包埋机、RM2255半自动石蜡切片机(LEICA,德国),OLYSIA-BioReport图像拍摄系统(Olympus,日本),5430R台式高速冷冻离心机(Eppendorf,德国),酶联免疫检测仪(Thermo Labsystems,芬兰),QuantStudio®5实时荧光定量PCR仪(Thermo Fisher Scientific,美国),EPS200电泳仪、Tanon5200全自动化学发光图像分析系统(上海天能科技有限公司,中国)。

1.2 实验动物

60只清洁级性成熟(56日龄)Wistar大鼠[上海西普尔-必凯实验动物有限公司,许可证号: SCXK(沪)2018-0006],其中雌性40只,体重(160.72±10.57)g,雄性20只,体重(243.12±16.22)g。饲养于温度(22±2)℃、湿度60%±10%的环境中。本实验经福建医科大学动物管理委员会批准(审批编号: FJMU IACUC 2021-Y-0261),实验程序严格参照《实验动物管理指南》实施。

1.3 实验动物处理与剂量依据

1.3.1 实验动物处理 适应性喂养一周后,将40只性成熟雌性Wistar大鼠按体重随机分为4组,每组

10 只,与 Wistar 雄鼠按 2:1 的比例进行合笼,以发现阴栓或阴道涂片观察到精子日为妊娠期第 0 天(GD0),从 GD0 开始给予含 0、1、5、25 mg·L⁻¹ NaAsO₂ 的饮用水至妊娠期结束。分娩所产生的子代(F1 代)于出生第 21 天(PND21)断母乳并开始常规饲养至 PND70。整个实验期间动物可以自由饮水、进食。

1.3.2 剂量选择依据 世界卫生组织制定的饮用水中总砷质量浓度(后称:浓度)国际限值为 0.01 mg·L⁻¹;而据统计我国仍有部分地区饮用水中的砷浓度为 0.05~4 mg·L⁻¹[9]。本研究选择 0.1、0.5、2.5 mg·L⁻¹ 作为砷暴露低、中、高剂量。由于人与动物的体表面积存在差异,大鼠的等效剂量约相当于人的 6.2 倍[10],上述砷的大鼠等效暴露剂量为 0.62、3.1、15.5 mg·L⁻¹,再根据相对分子质量得 NaAsO₂ 中含砷比例为 0.58,故计算出大鼠 NaAsO₂ 最终暴露剂量分别约为 1、5、25 mg·L⁻¹。

1.4 实验方法

1.4.1 肛殖距离测量及样本收集 于 PND70 测定生殖器到肛门的距离,记录为肛殖距离(mm),并经体重立方根调整后获得肛殖距离系数[5]。麻醉后摘眼球取血,采用颈椎脱臼法处死,取睾丸和附睾称重并以此除以体重,计算得到脏器系数(%)。

1.4.2 精子质量参数测定 取左侧附睾尾于培养基中制备成精子悬液,立马在镜下观察精子活动度,按精子活动状态分为 I 级(活动良好)、II 级(活动一般)、III 级(活动不良)、IV 级(不活动)[11]。用血细胞计数板计算每克附睾精子数,经吉姆萨染液染色后统计头部缺陷及尾部缺陷精子[12]。

1.4.3 睾丸曲细精管直径测量 将左侧睾丸置于 4% 多聚甲醛中固定,经流水冲洗、脱水、石蜡包埋后,按 5 μm 厚度切片。经常规苏木素-伊红染色后,每个组织测量 90 个曲细精管直径及生精上皮厚度。

1.4.4 ELISA 测定血清睾酮和雌二醇水平 取血后,静置 2 h 后于 4 °C 3000×g 离心 15 min,以制备血清,采用 ELISA 试剂盒测定血清中睾酮和雌二醇水平。

1.4.5 实时荧光定量 PCR 测定睾丸类固醇激素合成关键酶的 mRNA 表达水平 在睾丸组织中加入 1 mL RNAisoPlus,匀浆后根据相应试剂盒说明书依次提取总 RNA,逆转录为 cDNA,在荧光定量 PCR 仪中进行扩增。采用 2^{-ΔΔCt} 进行 mRNA 表达量计算。

测定的基因包括:类固醇急性调节蛋白(steroidogenic acute regulatory protein, *StAR*)、β-羟类固醇脱氢酶(3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase, *Hsd3β1*)、细胞色素 P450 侧链裂解酶(cytochrome p450 cholesterol

side-chain cleavage, *Cyp11a1*)、细胞色素 P450c17(cytochrome P450 17a-hydroxylase, *Cyp17a1*)、17β-羟类固醇脱氢酶(17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase, *Hsd17β3*)和 *Cyp19a1*。内参(*β-actin*)和上述类固醇激素合成关键酶的 mRNA 引物序列如表 1。

表 1 实时荧光定量 PCR 引物序列

Table 1 Primer sequences for quantitative real-time PCR

基因	正向(5'→3')	反向(5'→3')
<i>β-actin</i>	GACTCATCGTACTCTGCTTGCTG	GGAGATTACTGCCCTGGCTCCTA
<i>StAR</i>	TTCCTTGACATTGGGTTCC	AGGTGTTCCGACTGGAGGT
<i>Hsd3β1</i>	CGGTGTGGATGACAACAGAG	AGACCAGAAACCAAGGAGGAA
<i>Hsd17β3</i>	ATTATCCAGGTGCTGACCCC	AATCTTTGGGTGGTGCTGCT
<i>Cyp11a1</i>	GCCTTTTCTGGGCATAGTTG	GTGATGTGGGGACCAAGTTC
<i>Cyp17a1</i>	CTCTGCGTGGGTGTAATGAG	GTCGTCATCTCTGGGCACT
<i>Cyp19a1</i>	CCCAGGAAGAGCGTGTTAGA	CATCAAGCAGCATTTGGA

1.4.6 Western blotting 测定睾丸类固醇激素合成关键酶的蛋白表达水平 取睾丸组织于 RIPA 裂解液中提取总蛋白,采用 BCA 法测定蛋白浓度。采用 Western blotting 测定蛋白表达水平,首先经聚丙烯酰胺凝胶电泳,转膜后的 PVDF 膜置于 5%(体积分数)的脱脂奶粉封闭 3 h,随后加入一抗,4 °C 孵育过夜。漂洗 3 次后加入二抗(1:10 000),室温孵育 1 h,再经漂洗 3 次后滴加 ECL 化学发光液,最终在全自动化学发光图像分析系统中曝光成像。采用 Image J 1.8.0 软件进行灰度分析。

1.5 统计学分析

所有数据采用 IBM SPSS 24.0 进行统计分析。精子活动度及精子畸形以构成比(%)表示,组间比较采用卡方检验;其余数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析进行多组比较,若差异有统计学意义,则进一步进行各剂量组与对照组组间比较(方差齐采用 LSD 检验,方差不齐采用 Dunnett-*t* 检验)。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 妊娠期砷暴露对 F1 代成年雄鼠的体重、肛殖距离系数及脏器系数的影响

低、中剂量组子代成年雄性睾丸系数均高于对照组(均 $P<0.01$);低、中、高砷暴露剂量组附睾系数均较对照组高($P<0.01$ 或 $P<0.05$)。体重、睾丸和附睾重量及肛殖距离系数在各组间差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 2。

2.2 妊娠期砷暴露对 F1 代成年雄鼠精子质量的影响

每克附睾精子数在各组间差异无统计学意义($F=2.50, P=0.08$)。在精子活动力方面,各级活动度精子构

成比差异存在统计学意义($\chi^2=153.53, P<0.05$); 与对照组相比, I 级精子比例在低剂量组中增高($P<0.05$), 而在中、高剂量组下降(均 $P<0.05$); II、III 级精子比例在低、高剂量组均降低(均 $P<0.05$); IV 级精子比例在中、高剂量组上升(均 $P<0.05$)。详见表 3。不同精子形态缺陷见图 1。

表 2 妊娠期砷暴露对 F1 代成年雄性大鼠体重、肛殖距离系数、脏器重量及脏器系数的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 2 Body weight, anogenital distance index, organ weight, and organ coefficient of F1 adult male rats following prenatal NaAsO₂ exposure ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	体重/g	肛殖距离系数/ (mm·g ⁻³)	睾丸 重量/g	附睾 重量/g	脏器系数/%	
					睾丸	附睾
对照组	277.94±17.89	0.41±0.03	2.83±0.14	0.69±0.05	1.02±0.06	0.25±0.01
低剂量组	265.25±20.80	0.40±0.01	2.93±0.20	0.73±0.04	1.11±0.05 ^{aa}	0.28±0.02 ^{aa}
中剂量组	267.24±13.98	0.41±0.02	2.92±0.18	0.72±0.05	1.09±0.04 ^{aa}	0.27±0.01 ^a
高剂量组	274.69±12.58	0.42±0.03	2.92±0.14	0.73±0.07	1.07±0.05	0.27±0.01 ^a
F	1.04	0.41	0.62	1.12	4.62	5.32
P	0.39	0.75	0.61	0.36	<0.01	<0.01

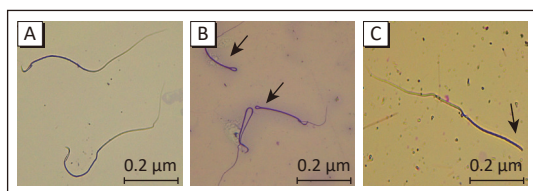
[注] 与对照组相比, a: $P<0.05$; aa: $P<0.01$ 。

表 3 妊娠期砷暴露对 F1 代成年雄性大鼠精子质量影响 ($n=6$)

Table 3 Sperm quality of F1 adult male rats following prenatal NaAsO₂ exposure ($n=6$)

组别	精子计数 ($\times 10^7$)	不同精子活力的比例/%				不同精子形态的比例/%		
		I 级	II 级	III 级	IV 级	正常	头部缺陷	尾部缺陷
对照组	1.17±0.38	45.16	14.33	15.66	24.83	74.92	4.50	20.58
低剂量组	0.79±0.18	51.67 ^a	9.33 ^a	12.50 ^a	26.50	71.75	5.92	22.33
中剂量组	0.85±0.33	38.50 ^a	13.50	13.33	34.67 ^a	71.67	6.50	21.83
高剂量组	1.03±0.33	34.83 ^a	10.50 ^a	11.33 ^a	43.33 ^a	73.58	5.83	20.58
F/ χ^2	2.50	153.53				7.07		
P	0.08	<0.05				0.32		

[注] 与对照组相比, a: $P<0.05$ 。



[注] A: 正常精子; B: 箭头指示精子尾部折叠; C: 箭头指示精子头部缺失。

图 1 妊娠期砷暴露对 F1 代成年雄性大鼠附睾精子形态的影响

Figure 1 Morphological variations of epididymal sperm from F1 adult male rats following prenatal NaAsO₂ exposure

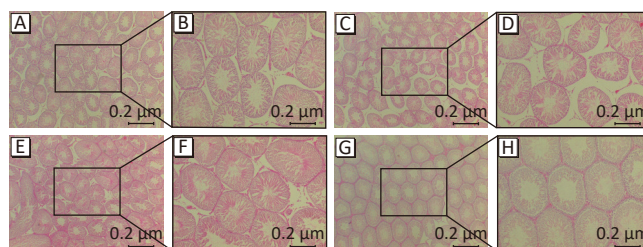
2.3 妊娠期砷暴露对 F1 代成年雄鼠睾丸形态和结构的影响

曲细精管直径和生精上皮厚度在各剂量组组间差异无统计学意义($F=2.36, P>0.05$; $F=1.80, P>0.05$), 详见表 4。各组生精细胞层结构基本完整(图 2)。

表 4 妊娠期砷暴露对 F1 代成年雄性大鼠睾丸曲细精管形态和结构的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 4 Development of seminiferous tubules in F1 adult male rats following prenatal NaAsO₂ exposure ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	曲细精管直径/ μm	生精上皮厚度/ μm
对照组	243.05±17.12	46.29±3.82
低剂量组	237.71±10.74	43.70±3.95
中剂量组	230.67±17.99	42.92±4.22
高剂量组	236.96±24.27	43.81±8.40
F	2.36	1.80
P	0.08	0.15



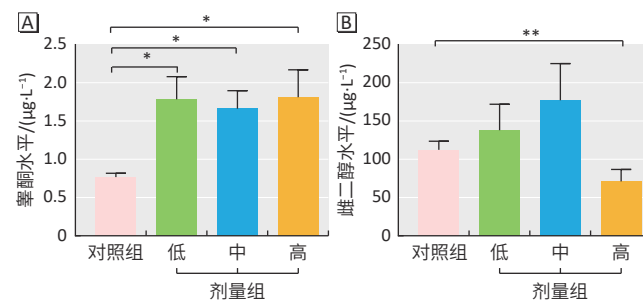
[注] A、B 为对照组, C、D 为低剂量组, E、F 为中剂量组, G、H 为高剂量组; 黑框指示 10 倍放大区域。

图 2 妊娠期砷暴露对 F1 代成年雄性大鼠睾丸组织形态学的影响

Figure 2 Testis morphometry of F1 adult male rats following prenatal NaAsO₂ exposure

2.4 妊娠期砷暴露对 F1 代成年雄鼠血清睾酮和雌二醇水平的影响

如图 3 所示, 各剂量组间血清睾酮水平总体存在差异($F=3.60, P<0.05$), 两两比较提示各暴露组血清睾酮水平均高于对照组(均 $P<0.05$); 各组间血清雌二醇水平差异有统计学意义($F=14.58, P<0.01$), 高剂量组血清中的雌二醇水平低于对照组($P<0.01$)。



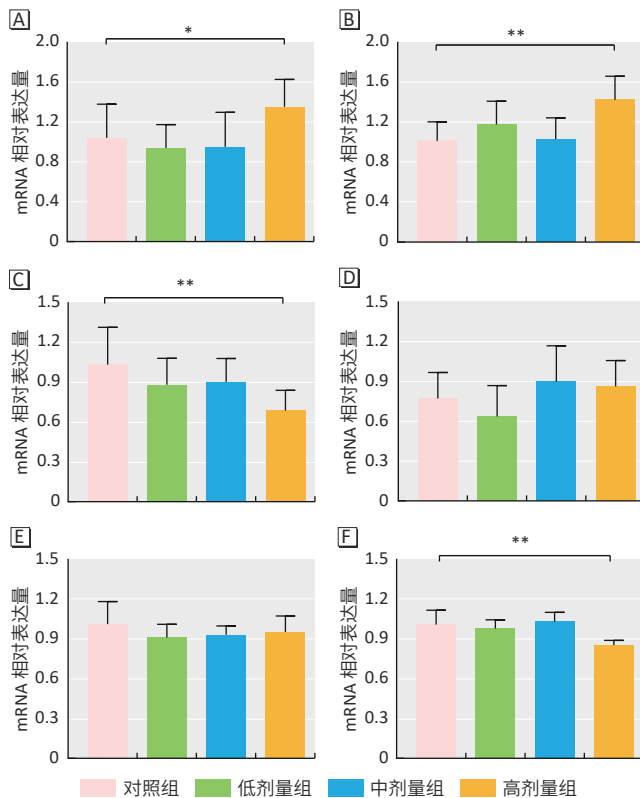
[注] A: 睾酮; B: 雌二醇。*: $P<0.05$; **: $P<0.01$ 。

图 3 妊娠期砷暴露对 F1 代成年雄性大鼠血清睾酮和雌二醇水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Figure 3 The levels of serum testosterone and estradiol of F1 adult male rats following prenatal NaAsO₂ exposure ($\bar{x} \pm s, n=10$)

2.5 妊娠期砷暴露对 F1 代成年雄鼠睾丸类固醇激素合成关键酶 mRNA 表达水平的影响

如图 4 所示,各剂量组 *StAR*、*Cyp11a1*、*Hsd3β1* 和 *Cyp19a1* 的 mRNA 表达水平总体存在差异(对应的 F 值分别为 3.26、4.49、3.77 和 7.00, P 值分别为 0.04、0.01、0.02、0.00)。进一步比较分析可得,与对照组相比,高剂量组的 *Hsd3β1* 和 *Cyp19a1* 的 mRNA 表达明显下调(均 $P < 0.01$),而 *StAR* 和 *Cyp11a1* 的 mRNA 表达则明显上调($P < 0.05$, $P < 0.01$),见图 4(A、B、C、F); *Cyp17a1* 和 *Hsd17β3* 的 mRNA 表达水平在各组间差异无统计学意义($F = 2.13$, $P > 0.05$; $F = 0.79$, $P > 0.05$),见图 4(D、E)。



[注] A: *Star* mRNA 相对表达水平; B: *Cyp11a1* mRNA 相对表达水平; C: *Hsd3β1* mRNA 相对表达水平; D: *Cyp17a1* mRNA 相对表达水平; E: *Hsd17β3* mRNA 相对表达水平; F: *Cyp19a1* mRNA 相对表达水平。*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$ 。

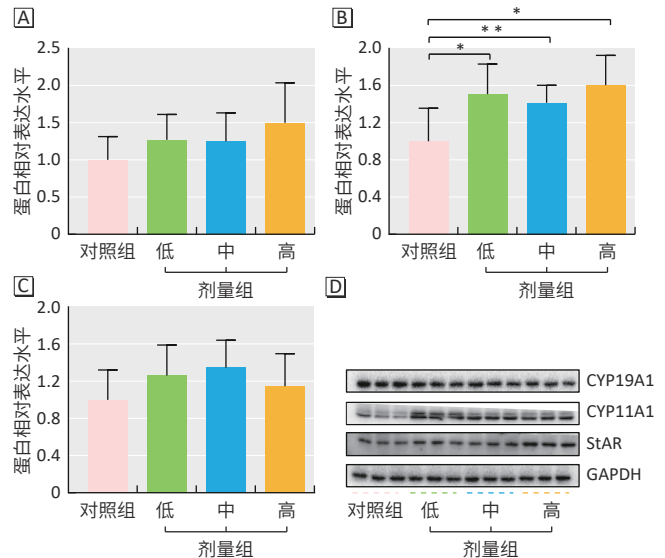
图 4 妊娠期砷暴露对 F1 代成年雄鼠睾丸类固醇激素合成关键酶的 mRNA 表达水平影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Figure 4 The relative mRNA levels of key steroidogenic enzyme of F1 adult male rats following prenatal NaAsO₂ exposure ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

2.6 妊娠期砷暴露对 F1 代成年雄鼠睾丸类固醇激素合成关键酶的蛋白表达水平的影响

进一步对上述差异表达的类固醇激素合成关键酶进行蛋白水平测定(图 5)。各剂量组间 CYP11A1 的

蛋白表达水平总体存在差异($F = 5.03$, $P < 0.05$),并且低、中、高剂量组 CYP11A1 蛋白表达量均高于对照组($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.05$),见图 5(B、D)。StAR 和 CYP19A1 的蛋白表达水平在各组间差异无统计学意义($F = 1.88$, $P > 0.05$; $F = 1.07$, $P > 0.05$),见图 5(A、C、D)。



[注] A: StAR 蛋白相对表达水平; B: CYP11A1 蛋白相对表达水平; C: CYP19A1 蛋白相对表达水平; D: 蛋白电泳图。*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$ 。

图 5 妊娠期砷暴露对 F1 代成年雄鼠睾丸类固醇激素合成关键酶蛋白表达水平影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Figure 5 The relative protein levels of key steroidogenic enzyme of F1 adult male rats following prenatal NaAsO₂ exposure ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

3 讨论

生命早期由于 DNA 修复、解毒酶和肝脏新陈代谢等保护机制尚未完全发挥作用,该时期毒物暴露可永久性地损害组织功能,对生殖系统的损害效应在成年期尤为凸显^[6]。愈来愈多证据表明,环境内分泌干扰物暴露,会扰乱胎儿激素合成和性别分化,引起成人睾丸功能障碍,降低精子质量^[3]。本研究发现妊娠期砷暴露可通过降低精子质量,诱导睾酮异常增高进而损害雄鼠成年后的生殖系统。

砷是一种生殖毒物,已有研究指出孕期砷暴露可通过干扰雄鼠胎儿期的雄性化编程,持续影响出生后的内、外生殖器的生长和发育^[5]。本研究结果显示孕期砷暴露对成年雄鼠的睾丸形态影响较小,各剂量组的肛殖距离系数、曲细精管直径和生精上皮厚度的下降无差异,提示本模型的孕期砷暴露可能对雄性化编程的影响甚微。而睾丸和附睾相对重量均有所增加,并且这与睾酮的变化趋势相一致,这可能是因为在睾酮及其代谢产物双氢睾酮的长期作用下雄性的性腺

组织肥大,从而引起性腺重量增加^[13]。

Tian 等^[14]的通过体外实验指出,相当低水平的砷暴露可刺激睾丸间质细胞分泌睾酮增多。在本模型中,环境浓度的砷进入母体后需要通过胎盘屏障才能真正到达子代体内,并随着日龄增长,子代组织中的砷含量逐渐下降,导致雄鼠成年时组织中砷蓄积量更低^[15]。本研究进一步探讨了孕期砷暴露是否会损害间质细胞的类固醇激素合成分泌途径,从而引起睾酮释放的变化。StAR 将胆固醇从间质细胞细胞质转移到线粒体内膜,然后在 CYP11A1 作用下转化为孕烯醇酮;孕烯醇酮可通过 17 α -羟基孕烯醇酮(Δ 5)和/或孕酮(Δ 4)途径转化为睾酮,其中主要涉及的关键酶有 HSD3 β 1、CYP17A1 和 HSD17 β 3^[16]。Cyp17a1 和 Hsd17 β 3 的 mRNA 的表达水平没有改变,说明这两个基因对孕期砷暴露作用可能不够敏感^[17]。高剂量组的 StAR 和 Cyp11a1 基因表达水平明显增加,此外,低、中、高剂量组均见 CYP11A1 蛋白表达增加,它们保证了睾酮合成前体的供应。而高剂量组砷暴露抑制 Hsd3 β 1 基因表达可能是一种负反馈调节,抑制性激素合成前体向睾酮转化^[18]。此外,间质细胞中部分睾酮可在 CYP19A1 的作用下转化成雌二醇,以维持体内的雌、雄激素平衡^[16],因此本研究进一步探讨了 CYP19A1 表达及血清雌二醇水平。结果仅见高剂量组的睾酮进一步转化过程受到抑制,雌二醇及 cyp19a1 基因表达水平降低;但低、中剂量组尚未出现此效应。由此推测,在本模型中子代雄鼠体内睾酮水平增加的可能是由于 CYP11A1 表达增加所致;另外,高剂量暴露下睾酮的转化途径受到抑制。

精子质量是评估男性生殖能力最直接的指标之一,精子总数主要用于衡量睾丸产生精子的能力,精子活动度及精子形态可在一定程度上预测受孕能力以及生育终点^[19]。精子生成主要由下丘脑-垂体-睾丸内分泌轴介导调控,参与其中的一种或几种性激素出现失衡异常都将影响精子质量^[20],但目前尚不清楚血清睾酮过高是否会通过负反馈调节来抑制睾丸内的睾酮水平,从而抑制精子发生及精子释放。另外,已有研究明确指出砷可在睾丸和附睾中蓄积发挥直接毒性作用以损害其功能^[21]。妊娠期砷暴露可通过胎盘屏障进入并长期蓄积于子代体内^[15]。Reddy 等^[22]研究发现,母鼠孕期和哺乳期持续暴露于低水平(0.4 mg·L⁻¹) NaAsO₂,雄性子鼠成年时的精子总数下降。本研究中,附睾尾的精子总数在各剂量组也略有下降趋势,但差异无统计学意义。附睾的精子数量除了受睾丸的精子

生成能力影响,还受制于精子通过时间^[11],毒物蓄积可加速精子在附睾中运输速度^[23],引起精子到达附睾尾部的时间更短。本暴露模型中,砷可能对精子通过时间的的影响更大,在一定程度上掩盖了其对于精子生成能力的损害效应,但仍需进一步研究验证。此外精子鞭毛中含有大量富含硫醇的蛋白质以维持精子的活力,砷是一种硫醇抑制剂,可以与精子鞭毛的巯基结合降低精子活动能力^[24]。值得注意的是,在本研究中低剂量组 I 级活力的精子比例增高,而中、高剂量组降低,这可能与亚砷酸盐可引起毒物兴奋效应(hormesis effect)有关,即在低剂量暴露时机体表现出适应性或保护性效应,随着剂量增高表现出抑制性作用^[25],但具体的作用机制仍需进一步研究探讨。

综上所述,妊娠期环境浓度砷暴露可刺激子代雄性大鼠睾酮分泌增加,破坏机体性激素平衡,以及降低子代雄性大鼠的精子质量。本实验拓展了对砷的发育毒性及砷暴露对雄性生殖影响的认识,但深入的作用机制有待进一步研究。

参考文献

- [1] VALLES S, HERNÁNDEZ-ÁNCHEZ J, DIPP VR, et al. Exposure to low doses of inorganic arsenic induces transgenerational changes on behavioral and epigenetic markers in zebrafish (*Danio rerio*) [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2020, 396: 115002.
- [2] MARTINEZ VD, LAM WL. Health effects associated with pre- and perinatal exposure to arsenic [J]. *Front Genet*, 2021, 12: 664717.
- [3] HO SM, CHEONG A, ADGENT MA, et al. Environmental factors, epigenetics, and developmental origin of reproductive disorders [J]. *Reprod Toxicol*, 2017, 68: 85-104.
- [4] 何志全,高迎冬,李三华,等. 孕染砷对胎鼠睾丸前精原细胞发育潜能的影响 [J]. *中国兽医科学*, 2016, 46(7): 928-933.
HE ZQ, GAO YD, LI SH, et al. Effects of pregestational arsenic on developmental potential of fetal rat testicular pre-primary cells [J]. *Chin Vet Sci*, 2016, 46(7): 928-933.
- [5] SOUZA AC F, MACHADO-NEVES M, BASTOS DS S, et al. Impact of prenatal arsenic exposure on the testes and epididymides of prepubertal rats [J]. *Chem Biol Interact*, 2021, 333: 109314.
- [6] FIANDANESE N, BORROMEO V, BERRINI A, et al. Maternal exposure to a mixture of di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) and polychlorinated biphenyls (PCBs) causes reproductive dysfunction in adult male mouse offspring [J]. *Reprod Toxicol*, 2016, 65: 123-132.
- [7] ISTVAN M, RAHBAN R, DANANCHE B, et al. Maternal occupational exposure to endocrine-disrupting chemicals during pregnancy and semen parameters in adulthood: results of a nationwide cross-sectional study among Swiss conscripts [J]. *Hum Reprod*, 2021, 36(7): 1948-1958.
- [8] YIN G, XIA L, HOU Y, et al. Transgenerational male reproductive effect of prenatal arsenic exposure: abnormal spermatogenesis with Igf2/H19 epigenetic alteration in CD1 mouse [J]. *Int J Environ Health Res*, 2022, 32(6): 1248-1260.

- [9] SHANKAR S, SHANKER U, SHIKHA. Arsenic contamination of groundwater: a review of sources, prevalence, health risks, and strategies for mitigation [J]. *ScientificWorldJournal*, 2014, 2014: 304524.
- [10] REAGAN-SHAW S, NIHAL M, AHMAD N. Dose translation from animal to human studies revisited[J]. *FASEB J*, 2008, 22(3): 659-661.
- [11] SOUZA AC F, MARCHESI SC, FERRAZ RP, et al. Effects of sodium arsenate and arsenite on male reproductive functions in Wistar rats[J]. *J Toxicol Environ Health A*, 2016, 79(6): 274-286.
- [12] 逢健, 孙中义. 小剂量玉米赤霉烯酮损害雄性小鼠生殖能力的研究[J]. *第三军医大学学报*, 2017, 39(12): 1225-1230.
- PANG J, SUN ZY. Low-dose zearalenone exposure impairs reproductive capacity of male mice[J]. *J Third Mil Med Univ*, 2017, 39(12): 1225-1230.
- [13] SHERRILL JD, SPARKS M, DENNIS J, et al. Developmental exposures of male rats to soy isoflavones impact Leydig cell differentiation[J]. *Biol Reprod*, 2010, 83(3): 488-501.
- [14] TIAN M, WANG YX, WANG X, et al. Environmental doses of arsenic exposure are associated with increased reproductive-age male urinary hormone excretion and *in vitro* Leydig cell steroidogenesis[J]. *J Hazard Mater*, 2021, 408: 124904.
- [15] XIS, JIN Y, LV X, et al. Distribution and speciation of arsenic by transplacental and early life exposure to inorganic arsenic in offspring rats[J]. *Biol Trace Elem Res*, 2010, 134(1): 84-97.
- [16] WALKER C, GARZA S, PAPADOPOULOS V, et al. Impact of endocrine-disrupting chemicals on steroidogenesis and consequences on testicular function[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2021, 527: 111215.
- [17] ZENG Q, YI H, HUANG L, et al. Reduced testosterone and Ddx3y expression caused by long-term exposure to arsenic and its effect on spermatogenesis in mice[J]. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2018, 63: 84-91.
- [18] ALAMDAR A, XI G, HUANG Q, et al. Arsenic activates the expression of 3 β -HSD in mouse Leydig cells through repression of histone H3K9 methylation[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2017, 326: 7-14.
- [19] World Health Organization. WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen[M]. 5th ed. Switzerland: WHO Press, 2010: 12-102.
- [20] 吴剑锋. 男性基础性激素水平与精子质量参数的相关性探讨[J]. *现代检验医学杂志*, 2020, 35(3): 69-71, 77.
- WU JF. Correlation between male basic sex hormones and sperm quality parameters[J]. *J Mod Lab Med*, 2020, 35(3): 69-71, 77.
- [21] DE ALMEIDA LIMA G D, SERTORIO MN, SOUZA AC F, et al. Fertility in male rats: disentangling adverse effects of arsenic compounds[J]. *Reprod Toxicol*, 2018, 78: 130-140.
- [22] REDDY M V B, SUDHEER S D, SASIKALA P, et al. Effect of transplacental and lactational exposure to arsenic on male reproduction in mice[J]. *J Reprod Infertil*, 2011, 2(3): 41-45.
- [23] FERNANDEZ CD B, PORTO EM, ARENA AC, et al. Effects of altered epididymal sperm transit time on sperm quality[J]. *Int J Androl*, 2008, 31(4): 427-437.
- [24] CHIOU T J, CHU ST, TZENG W F, et al. Arsenic trioxide impairs spermatogenesis via reducing gene expression levels in testosterone synthesis pathway[J]. *Chem Res Toxicol*, 2008, 21(8): 1562-1569.
- [25] CHEN H, ZHAO T, SUN D, et al. Changes of RNA N⁶-methyladenosine in the hormesis effect induced by arsenite on human keratinocyte cells[J]. *Toxicol in Vitro*, 2019, 56: 84-92.

(英文编辑: 汪源; 责任编辑: 陈姣, 丁瑾瑜)

(上接第 1037 页)

- [38] GAO P, WU Y, HE L, et al. Acute effects of ambient nitrogen oxides and interactions with temperature on cardiovascular mortality in Shenzhen, China [J]. *Chemosphere*, 2022, 287: 132255.
- [39] KINNEY P L. Climate change, air quality, and human health[J]. *Am J Prev Med*, 2008, 35(5): 459-467.
- [40] KEATINGE W R, COLESHAW S R K, EASTON J C, et al. Increased platelet and red cell counts, blood viscosity, and plasma cholesterol levels during heat stress, and mortality from coronary and cerebral thrombosis[J]. *Am J Med*, 1986, 81(5): 795-800.
- [41] SCHNEIDER A, PANAGIOTAKOS D, PICCIOTTO S, et al. Air temperature and inflammatory responses in myocardial infarction survivors[J]. *Epidemiology*, 2008, 19(3): 391-400.
- [42] GASPARRINI A, GUO Y, HASHIZUME M, et al. Mortality risk attributable to high and low ambient temperature: a multi-country observational study[J]. *Lancet*, 2015, 386(9991): 369-375.
- [43] MARTINEZ-NICOLAS A, MEYER M, HUNKLER S, et al. Daytime variation in ambient temperature affects skin temperatures and blood pressure: ambulatory winter/summer comparison in healthy young women[J]. *Physiol Behav*, 2015, 149: 203-211.
- [44] KAN H, LONDON SJ, CHEN H, et al. Diurnal temperature range and daily mortality in Shanghai, China[J]. *Environ Res*, 2007, 103(3): 424-431.
- [45] BROOK RD, RAJAGOPALAN S, POPE III CA, et al. Particulate matter air pollution and cardiovascular disease: an update to the scientific statement from the American Heart Association[J]. *Circulation*, 2010, 121(21): 2331-2378.
- [46] ZANOBETTI A, SCHWARTZ J. The effect of fine and coarse particulate air pollution on mortality: a national analysis[J]. *Environ Health Perspect*, 2009, 117(6): 898-903.
- [47] YE B, JI X, YANG H, et al. Concentration and chemical composition of PM_{2.5} in Shanghai for a 1-year period[J]. *Atmos Environ*, 2003, 37(4): 499-510.

(英文编辑: 汪源; 责任编辑: 丁瑾瑜)